

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Juli 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/057335 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/543**,
C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/004137

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Dezember 2003 (15.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 59 821.5 19. Dezember 2002 (19.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE];
Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

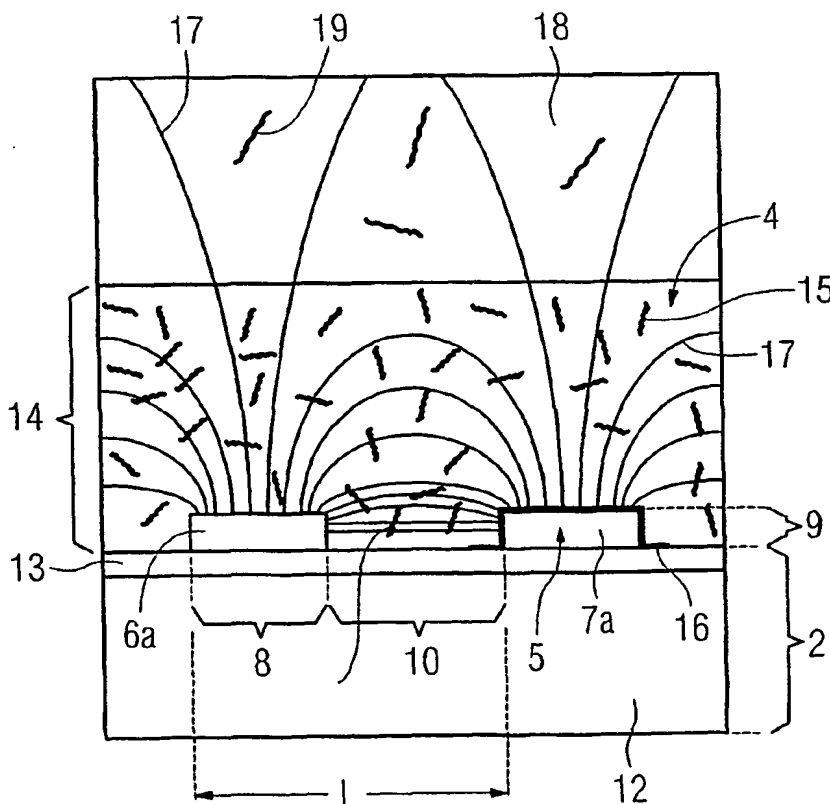
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STANZEL, Manfred**
[DE/DE]; Taunusstrasse 100, 91056 Erlangen (DE). **GUM-
BRECHT, Walter** [DE/DE]; In der Röte 1, 91074 Herzo-
genaurach (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **SIEMENS AKTIENGE-
SELLSCHAFT**; Postfach 22 16 34, 80506 München
(DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: BIOCHIP

(54) Bezeichnung: BIO-CHIP



(57) Abstract: The invention relates to a biochip comprising a flat carrier and an array of spots containing catcher molecules which are arranged on said carrier. Each spot is associated with a microelectrode arrangement for impedance spectroscopic detection of binding events occurring between the catcher molecules and the target molecules applied by means of an analyte solution. In order to increase the sensitivity or the binding-specific measuring effects of the bio-chip, the electrode arrangement is at least partially embedded in a hydrophilic reaction layer containing catcher molecules and which is permeable to target molecules.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Bio-Chip mit einem Flachträger und einem darauf angeordneten Array von Fängermolekülen enthaltenden Spots, wobei jedem Spot eine Mikroelektroden-Anordnung zur impedanzspektroskopischen Detektion von Bindungsereignissen zwischen den Fängermolekülen und mittels einer Analytlösung applizierten Zielmolekülen zuge-

ordnet ist. Zur Erhöhung der Sensitivität bzw. des bindungsspezifischen Messeffekts des Bio-Chips ist die Elektrodenanordnung zumindest teilweise in eine Fängermoleküle enthaltende

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/057335 A1



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** CA, JP, US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Beschreibung

Bio-Chip

- 5 Die Erfindung betrifft einen Bio-Chip, insbesondere DNA-Chip, gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruches 1.

Bio- bzw. DNA-Chips umfassen einen Flachträger, auf dessen einer Seite wenigstens ein Spot-Array, also eine rasterartige
10 Anordnung von Analysepositionen vorhanden ist. Die Spots enthalten auf der Trägeroberfläche immobilisierte Sonden- oder Fängermoleküle, beispielsweise Oligonucleotide. In einer auf einen Spot applizierten Analytlösung enthaltene Zielmoleküle, beispielsweise DNA-Bruchstücke koppeln an die Fängermoleküle
15 an. Die Umwandlung solcher Koppel- bzw. Bindungsereignisse in detektierbare Signale erfolgt mit optischen, piezoelektrischen, elektrochemischen, kalorimetrischen oder impedanzspektroskopischen Methoden.

20 Bei einem aus DE 196 10 115 C2 bekannten impedanzspektroskopisch auslesbaren DNA-Chip ist auf einer Sensorfläche eine interdigitale Elektrodenanordnung vorhanden, wobei Fängermoleküle auf den Elektroden und den zwischen den Elektroden angeordneten Flächen immobilisiert sind. Die Ankopplung von
25 Zielmolekülen an die Fängermoleküle führt z.B. aufgrund von Ladungsänderungen zu einer Änderung des von den Elektroden erzeugten elektrischen Wechselfeldes bzw. allgemein zu einer Änderung einer elektrischen Eigenschaft in der Umgebung der Elektroden, z.B. der Impedanz. Eine Messung einer Impedanzänderung lässt sich mit einer beispielsweise 2-poligen interdi-
30 gitalen Elektrodenanordnung durchführen, bei der die Elektroden aus mehreren Teilelektroden gebildet sind.

Problematisch bei letzter Art der Detektion von Bindungsereignissen ist, dass sich die Abmessungen der Elektrodenstrukturen um Größenordnungen von molekularen Dimensionen unterscheiden. Mit noch vertretbarem technischen Aufwand lassen
35

sich Elektroden herstellen, mit deren Breite und Abstand zusammengenommen einen Wert L (= Breite + Abstand) von etwa 2 bis 20 μm und eine Höhe von etwa 0,1 bis 0,5 μm aufweisen.

5 Der impedanzspektroskopisch erfassbare Bereich des elektrischen Feldes einer solchen Elektrodenanordnung erstreckt sich etwa 1 bis 5 L (= 2 bis 100 μm) über die Trägeroberfläche bzw. die von der Elektrodenanordnung aufgespannte Ebene hinaus. Dagegen hat ein beispielsweise 100 Basenpaare aufwei-
10 sendes Fängermolekül eine Länge von nur etwa 30 nm. Entsprechend gering ist der Einfluss von Bindungsereignissen in einer auf der Sensorfläche bzw. den Elektroden immobilisierten monomolekularen Schicht von Fängermolekülen auf das elektrische Feld, insbesondere dann, wenn nur wenige Bindungsvorgänge
15 stattfinden. In der Veröffentlichung „Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors“, P. van Gerwen et al, Sensors and Actuators B 49, 1998, 72 - 80 wird zur Lösung des angesprochenen Problems eine Annäherung der Dimensionen von Elektrodenstrukturen an die Dimensionen von
20 DNA-Zielmolekülen vorgeschlagen, wobei Elektrodenstrukturen mit Teilelektroden angestrebt werden, deren Breiten und gegenseitigen Abstände etwa im Bereich von 250 bis 500 nm liegen. Solche Dimensionen sind jedoch mit einem erhöhten Herstellungsaufwand verbunden.

25 Weiterhin ist aus der WO 98/19153 A1 ein Sensor für biochemische Anwendungen bekannt, bei dem Elektroden vorhanden sind, die in ein leitfähiges Polymer eingebettet sind. Das leitfähige Polymer ist dabei in Kontakt mit dem Analyten, in dem
30 durch Wechselstrombeeinflussung ein biochemischer Prozess stattfindet. Dabei werden Prozessänderungen über das leitfähige Polymer als Impedanzänderungen zum Elektrodensystem weitergegeben und erfasst.

35 Die Sensitivität eines solchermaßen aufgebauten Sensorchips ist problematisch. Außerdem ist das Einbetten bzw. Beschich-

ten der Elektroden n ein leitfähiges Polymer aufwendig, so dass der beschriebene Biosensor nicht praxistauglich ist.

Ausgehend vom Stand der Technik ist es Aufgabe der Erfindung, einen kostengünstig herstellbaren, impedanzspektroskopisch auslesbaren DNA-Chip mit verbesserter Sensitivität vorzuschlagen.

Die Aufgabe ist erfindungsgemäß durch die Merkmale des Patentanspruchs 1 gelöst. Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Bei der Erfindung ist die Elektrodenanordnung zumindest teilweise in eine für Zielmoleküle durchlässige hydrophile Reaktionsschicht eingebettet, in der immobilisierte Fängermoleküle dreidimensional verteilt sind. Die Reaktionsschicht ist dabei so dimensioniert, dass sie von dem überwiegenden Teil des von der Elektrodenanordnung erzeugten elektrischen Feldes bzw. von deren impedanzspektroskopischen Erfassungsbereich durchdrungen ist.

Ein wesentlicher Vorteil eines erfindungsgemäßen Biochips besteht darin, dass innerhalb der Reaktionsschicht eine wesentlich größere Anzahl von Fängermolekülen angeordnet werden kann als in einer monomolekularen Schicht auf der Trägeroberfläche und auf den Oberflächen der Elektroden. Hinzu kommt aber noch, dass die Abmessung der Reaktionsschicht an den vom elektrischen Feld bzw. von dessen Feldlinien durchdrungenen Raum angepasst ist, so dass eine große Anzahl bzw. eine hohe Konzentration von Fängermolekülen mit etwa homogener Verteilung innerhalb des genannten Erfassungsbereiches vorhanden ist. Die Folge ist eine weitaus größere Beeinflussung des elektrischen Feldes bzw. des impedanzspektroskopischen Erfassungsbereiches der Elektrodenanordnung. Ein derart ausgestalteter DNA-Chip weist eine entsprechend größere Messempfindlichkeit bzw. Sensitivität auf.

Die Dicke der Reaktionsschicht sollte vorteilhafterweise maximal 100 μm betragen. Für die Praxis darf die Dicke der Reaktionsschicht aber nicht zu groß gewählt werden, weil daraus zu lange Diffusionswege und damit verbunden zu lange Reaktionszeiten für den Transport der Zielmoleküle zu den Fängermolekülen resultieren würden.

Bei Elektrodenbreiten im Bereich von etwa 1 μm und ebensolchen Abständen beträgt die Dicke der Reaktionsschicht zwischen 2 und 10 μm , beispielsweise etwa 3 μm bei einem Zweipol-Mikroelektrodensystem und etwa 7 μm bei einem Vier-Pol-Mikroelektrodensystem.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung weist die Reaktionsschicht eine Dicke auf, die etwa im Bereich von 1 - 5 L liegt, wobei L die Summe aus der Elektrodenbreite und dem Elektrodenabstand ist. Dadurch ist gewährleistet, dass einerseits ein Bereich des elektrischen Feldes mit relativ hoher Feldliniendichte zur Detektion von Bindungsereignissen genutzt wird und andererseits die Dicke der Reaktionsschicht nicht so groß ist, dass sie das Eindiffundieren von Zielmolekülen und Reaktanten behindert.

Mit einer bis etwa 95°C thermisch stabilen Reaktionsschicht ist ein DNA-Chip der in Rede stehenden Art für PCR-Reaktionen anwendbar. Thermisch stabil soll dabei bedeuten, dass die Reaktionsschicht auch bei der genannten Temperatur derart beschaffen ist, dass sie sich nicht auflöst, dass sie Fängermoleküle festhält, dass in ihr Reaktionen zwischen Ziel- und Fängermolekülen ungehindert stattfinden können und dass sie auch ihre sonstigen Eigenschaften im wesentlichen beibehält. Bei einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung enthält die Reaktionsschicht Polymere mit Kopplungsgruppen, an die Fängermoleküle kovalent gebunden sind. Dadurch ist sicher gewährleistet, dass Bindungspaare aus Ziel- und Fängermolekülen bei Spülvorgängen während des Analysenganges in der Reaktionsschicht zurückgehalten werden. Eine besonders geeignete Reak-

tionsschicht besteht aus einem Hydrogel. Hydrogele bilden ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form, das einen Stoffaustausch mit einem überwiegend wässrigen Analyten erlaubt. Als besonders geeignet haben sich radikalisch vernetzbare Hydrogele auf Acrylamidbasis mit Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat als Kopplungsgruppen erwiesen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst der Flachträger des DNA-Chips eine Siliziumschicht und eine damit verbundene Isolierschicht, wobei letztere auf ihrer der Siliziumschicht abgewandten Seite die Elektrodenanordnung und die Reaktionsschicht trägt. Bei einer solchen Anordnung lässt sich die elektrische Verschaltung der Elektrodenstruktur mit aus der Si-Halbleitertechnologie bekannten Analog- und Digital-Schaltungen verwirklichen.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen:

Fig. 1 eine vereinfachte perspektivische Darstellung eines einen Flachträger und ein Spot-Array umfassenden Biochips,

Fig. 2 einen Querschnitt durch einen Spot entsprechend Linie II-II in Fig. 1, in vergrößerter ausschnittsweiser Darstellung,

Fig. 3 einen Ausschnitt einer einem Spot zugeordneten Elektrodenanordnung,

Fig. 4 eine Ausführungsform eines Biochips mit einer 4-poligen Elektrodenanordnung in einer Fig. 2 entsprechenden Darstellung, und

Fig. 5 die Elektrodenanordnung des Biochips von Fig. 4 in einer Fig. 3 entsprechenden Darstellung.

Wie Fig. 1 zeigt, umfasst ein Biochip 1 einen Flachträger 2, auf dessen einer Seite ein Spot-Array 3 aufgebracht ist. Ein

Spot 4 enthält immobilisierte Fängermoleküle, beispielsweise Oligonucleotide. Wird auf einen Spot eine Analytlösung mit unbekannten Zielmolekülen aufgebracht, so kommt es bei entsprechender Übereinstimmung in der Basensequenz zu einer An-
5 kopplung des Zielmoleküls an das Fängermolekül. Die durch ein solches Bindungsereignis hervorgerufene Eigenschaftsänderung, z.B. Änderungen des spezifischen Widerstandes oder der Dielektrizitätskonstante, wird mit einer Elektrodenanordnung 5 impedanzspektroskopisch erfasst.

Bei dem Ausführungsbeispiel von Fig. 2 ist eine 2-polige Elektrodenanordnung vorhanden. Diese ist beispielsweise mit Hilfe eines photolithographischen Verfahrens auf den Flach-
10 träger 2 aufgebracht. Die Elektrodenanordnung 5 umfasst zwei Elektroden 6, 7, die in Form einer Interdigitalstruktur ausgebildet sind. D.h. jede Elektrode umfasst mehrere streifenförmige parallel zueinander verlaufende Teilelektroden 6a,
15 7a, die sich jeweils in den Zwischenraum zweier Teilelektroden der jeweils anderen Elektroden hinein erstrecken. Die Teilelektroden 6a, 7a sind durch einen ebenfalls streifenförmigen, sich quer zu den Teilelektroden 6a, 7a streckenden Verbindungsleiter 6b, 7b miteinander verbunden. Die Elektroden 6, 7 sind mit einer Wechselspannung z.B. im Megahertzbe-
20 reich beaufschlagt. Die Breite 8 der Teilelektroden 6a, 7a beträgt ca. 1 μm , ihre Höhe 9 beträgt etwa 100 bis 500 nm. Zwischen den Teilelektroden 6a, 7a ist ein Abstand 10 von ebenfalls ca. 1 μm vorhanden.

Der Flachträger 2 umfasst eine Siliziumschicht 12 und eine
30 zwischen dieser und den Elektroden 6, 7 angeordnete Isolierschicht 13 z.B. aus Siliziumdioxid oder Siliziumnitrid. Die für die impedanzspektroskopische Messung von Bindungsereignissen erforderlichen elektrischen Verschaltungen und Bauteile sind in herkömmlicher Weise durch eine entsprechende
35 Strukturierung der Siliziumschicht (nicht dargestellt) realisiert. Auf der Isolierschicht 13 ist eine Reaktionsschicht 14

aus einem Hydrogel aufgebracht, welches weiter unten näher beschrieben wird.

In der Reaktionsschicht 14 bzw. dem Hydrogel sind Fängermoleküle 15, die in Fig. 2 überdimensioniert und symbolisch dargestellt sind, eingebettet und homogen verteilt. Ein Fängermolekül mit 300 Basen weist etwa eine Länge von 100 nm auf. Demzufolge hat eine monomolekulare Schicht von Fängermolekülen bei herkömmlichen Biochips allenfalls etwa eine Dicke entsprechend der Linie 16 in Fig. 2. Es ist leicht einsehbar, dass eine solche Schicht relativ wenige Fängermoleküle 15 aufnehmen und dementsprechend im Falle von Bindungsereignissen das elektrische Feld nur gering beeinflussen kann. Demgegenüber ist bei einem erfindungsgemäßen Biochip der Fängermoleküle enthaltende und von Feldlinien durchdrungene Reaktionsbereich wesentlich erweitert und bietet Platz für eine um mehrere Zehnerpotenzen größere Anzahl von Zielmolekülen 15. Wird auf ein solcher Art ausgestaltete Spot-Arrays 3 bzw. auf einen Spot 4 eine Analytlösung 18 aufgebracht, so finden die darin enthaltenen Zielmoleküle 19, was in Fig. 2 ebenfalls übertrieben groß und nur symbolisch dargestellt ist, eine wesentlich größere Anzahl möglicher Bindungspartner in Form der Fängermoleküle 15 vor. Die Reaktionsschicht 14 ist vorzugsweise so dimensioniert, bzw. weist eine derartige Dicke auf, dass der impedanzspektroskopische Erfassungsbereich praktisch vollständig ausgenutzt ist, was bei einer Dicke der Reaktionsschicht von etwa 2 bis 100 μm auf jeden Fall erreicht wird und in der Praxis bereits bei 2 - 10 μm der Fall ist. Bei entsprechender Konzentration von Fängermolekülen 15 in diesem Bereich kann somit der bindungsspezifische Messeffekt des Biochips wesentlich erhöht werden.

Die Reaktionsschicht 14 ist so beschaffen, dass sie ein wässriges Reaktionsmedium zur Verfügung stellt. Weiterhin ist sie so beschaffen, dass Zielmoleküle 19 oder auch andere für eine Reaktion benötigte Stoffe, beispielsweise Polymerase, in sie

eindiffundieren können, ohne das dabei ihre Aktivität beeinträchtigt wird.

Wie schon oben erwähnt, wird erfindungsgemäß ein Hydrogel als Reaktionsschicht 14 verwendet. Ein Hydrogel stellt ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form bei gleichzeitiger Gewährleistung des Stoffaustausches in einer überwiegend wässrigen Umgebung dar. Durch Wahl der chemischen Zusammensetzung, was die Komponenten und deren Verhältnis untereinander betrifft, können die Eigenschaften der Hydrogele, wie Wassergehalt, Quellverhalten, mechanische Stabilität, etc. über weite Bereiche variiert werden.

Ein Hydrogel, das leicht herstellbar ist, und das eine gute Haftung sowohl zur Elektrodenanordnung 5 als auch zur Isolierschicht 13 aufweist, ist ein radikalisch vernetzbares Hydrogel auf Acrylamidbasis, das ein Comonomer enthält, welches eine kovalente Ankopplung entsprechend modifizierter Fängermoleküle über Linkergruppen ermöglicht. Das Hydrogel umfasst neben der Monomervorstufe des Polyacrylamids ein Vernetzungsmittel, wenigstens einen Radikalinitiator, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls wenigstens einen Weichmacher. Nach Schichtherstellung und anschließender thermischer bzw. Fotovernetzung wird ein mit Wasser quellbares Hydrogel erhalten, dass reaktive Linkergruppen zur Immobilisierung von Fängermolekülen enthält. Als Vernetzungsmittel werden Methylenbisacrylamid und/oder Dimethylacrylsäureester, beispielsweise Tetraethylenglykoldimethacrylat eingesetzt.

Durch eine Variation der Konzentrationen des Vernetzungsmittels lässt sich die Maschenweite des Hydrogels einstellen. Das verwendete Comonomer enthält Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat. Als Weichmacher eignet sich Mono-Di- und/oder Triethylenglykol. Die genannten Ausgangsstoffe sind mit einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, vorzugsweise mit Dimethylformamid vermengt.

Durch die Variation des Lösungsmittelsanteiles kann die Verarbeitungsviskosität eingestellt werden. Die Haftung an der Flachträgeroberfläche sowie an der Elektrodenanordnung 5 kann durch Beimengung üblicher Haftvermittler beispielsweise auf Silanbasis verstärkt werden.

In Fig. 4 und 5 ist ein Ausführungsbeispiel mit einer 4-polaren Elektrodenanordnung 20 dargestellt. Die Elektrodenanordnung 20 setzt sich aus zwei Stromelektroden 22, 23 und zwei Spannungs- bzw. Sondenelektroden 24, 25 zusammen. Die Stromelektroden 22, 23 sind entsprechend der Elektrodenanordnung 5 des Ausführungsbeispiels nach Fig. 2 angeordnet und ausgestaltet. Die Sondenelektroden 24, 25 sind ebenfalls streifenförmig und erstrecken sich als mäanderförmiger Doppelstrang durch die zwischen den Teilelektroden 22a und 23a vorhandenen Zwischenräume hindurch. Die Stromelektroden 22, 23 sind mit einem hochfrequenten Wechselstrom beaufschlagt. An den Sondenelektroden 24, 25 liegt ein Spannungsmesser 26 an, mit dem eine Veränderung des elektrischen Wechselfeldes in Folge von Bindungsereignissen detektierbar ist.

Die Messung kann somit unabhängig von den Stromelektroden erfolgen, so dass sich z.B. deren die Elektrodenimpedanz erhöhende Polarisierung nicht auf die Messung auswirken kann. Dagegen muss bei einer 2-poligen Elektrodenanordnung die Elektrodenimpedanz durch eine entsprechend hohe, messtechnisch ungünstige Messfrequenz gering gehalten werden, um den für die Messung ausschlaggebenden Widerstand der Analytlösung bzw. der Reaktionsschicht bestimmen zu können.

Zur Erfassung von durch Bindungsereignisse hervorgerufene Kapazitätsänderungen innerhalb der Reaktionsschicht ist eine 2-polige Elektrodenanordnung in Kombination mit sehr hohen Messfrequenzen ($> 1\text{MHz}$) vorteilhaft.

Patentansprüche

1. DNA-Chip mit einem Flachträger (2) und einem darauf angeordneten Array (3) von Fängermolekülen enthaltenden Spots(4),
5 wobei jedem Spot (4) eine Mikroelektroden-Anordnung (5) zur Detektion von Bindungsereignissen zwischen den Fängermolekülen und mittels einer Analytlösung applizierten Zielmolekülen zugeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrodenanordnung (5) zumindest teilweise in eine für Zielmoleküle
10 durchlässige hydrophile Reaktionsschicht (14) eingebettet ist, in der immobilisierte Fängermoleküle dreidimensional verteilt sind.
2. DNA-Chip nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine Dicke
15 der Reaktionsschicht (14) von 2 bis 100 μm .
3. DNA-Chip nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht eine Dicke aufweist, die etwa im Bereich von 1 bis 5 L liegt, wobei L die Summe aus Elektrodenbreite und
20 Elektrodenabstand ist.
4. DNA-Chip nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrodenbreite und der Elektrodenabstand im Bereich von 1 μm ($\hat{=}$ 1000 nm) liegen und dass die Reaktionsschicht eine Dicke zwischen 2 und 10 μm hat.
25
5. DNA-Chip nach Anspruch 3, wobei die Mikroelektrodenanordnung ein Zwei-Pol-System ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht eine Dicke von etwa 3 μm hat.
30
6. DNA-Chip nach Anspruch 3, wobei die Mikroelektrodenanordnung ein Vier-Pol-System ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht eine Dicke von etwa 7 μm hat.
7. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht (14) bis etwa 95°C thermisch stabil ist.
35

8. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht (14) Kopplungsgruppen zur kovalenten Bindung von Fängermolekülen enthält.

5

9. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht (14) ein Hydrogel ist.

10

10. DNA-Chip nach Anspruch 6, gekennzeichnet durch ein radikalisch vernetzbares Hydrogel auf Acrylamidbasis mit Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat als Kopplungsgruppen.

15

11. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 10, gekennzeichnet durch eine interdigitale Elektrodenanordnung (5).

20

12. DNA-Chip nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die interdigitale Elektrodenanordnung ein Zwei-Pol-Mikroelektrodensystem ist.

25

13. DNA-Chip nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die interdigitale Elektrodenanordnung ein Vier-Pol-Mikroelektrodensystem ist.

30

14. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Flachträger (2) eine Halbleiterschicht und eine damit verbundene Isolierschicht (13) umfasst, wobei letztere auf ihrer der Halbleiterschicht abgewandten Seite die Elektrodenanordnung (5) und die Reaktionsschicht (14) trägt.

15. DNA-Chip nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Halbleiterschicht eine Siliziumschicht (12) ist.



FIG 1

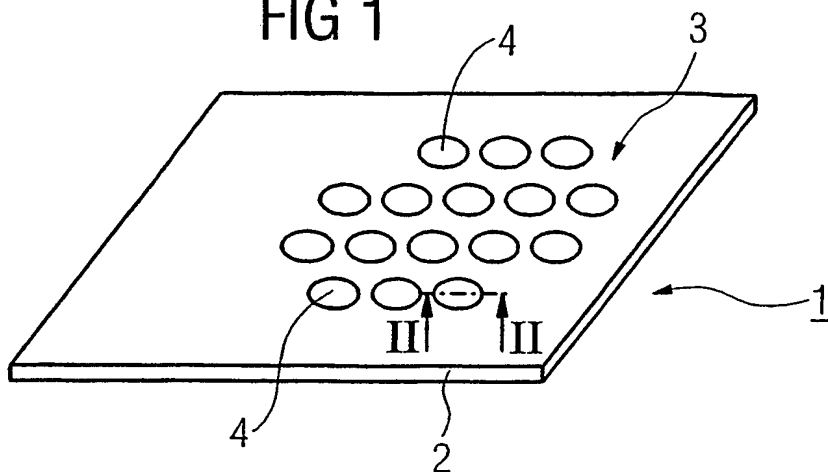


FIG 2

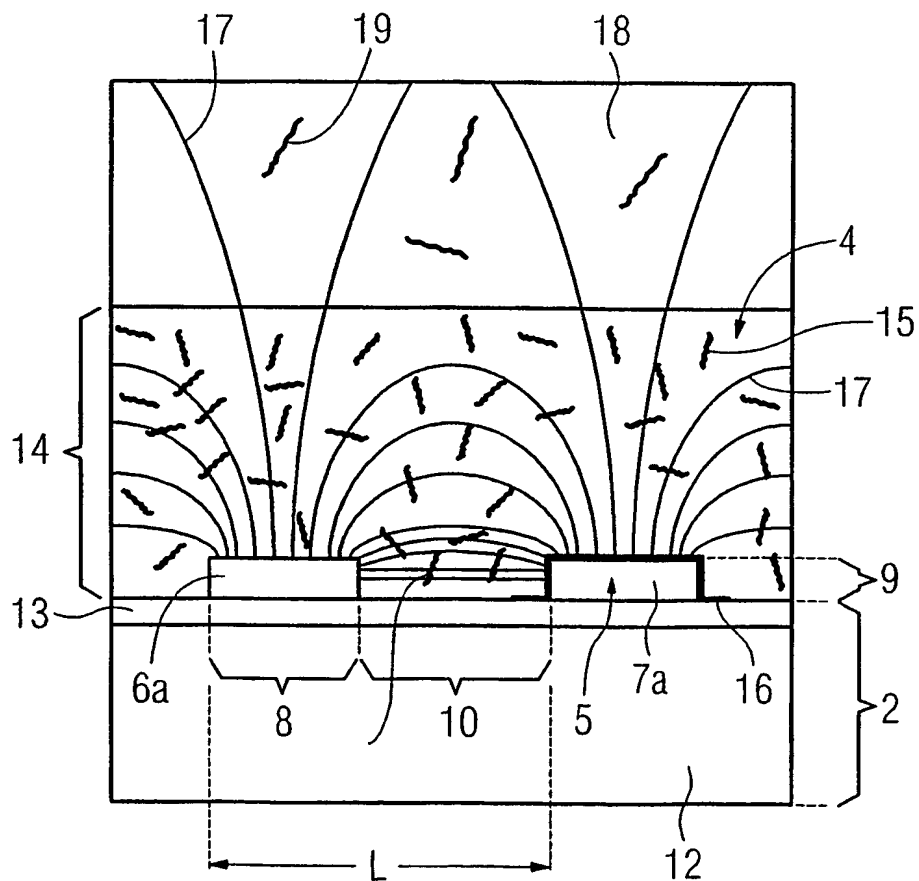


FIG 3

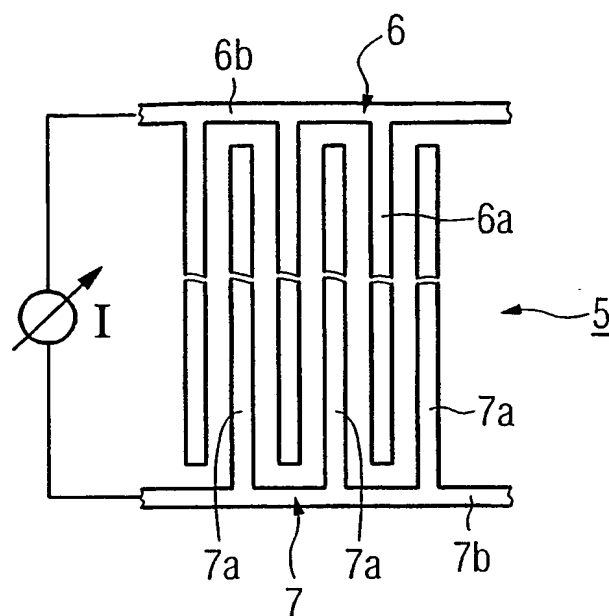


FIG 4

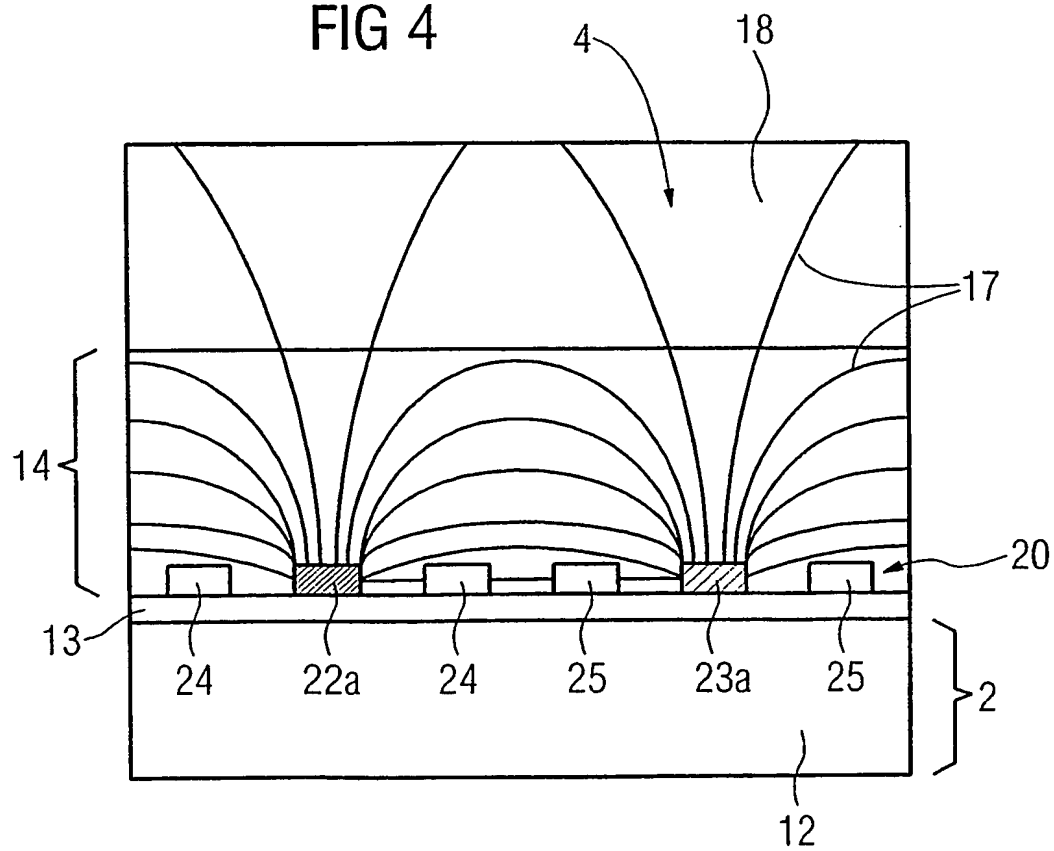
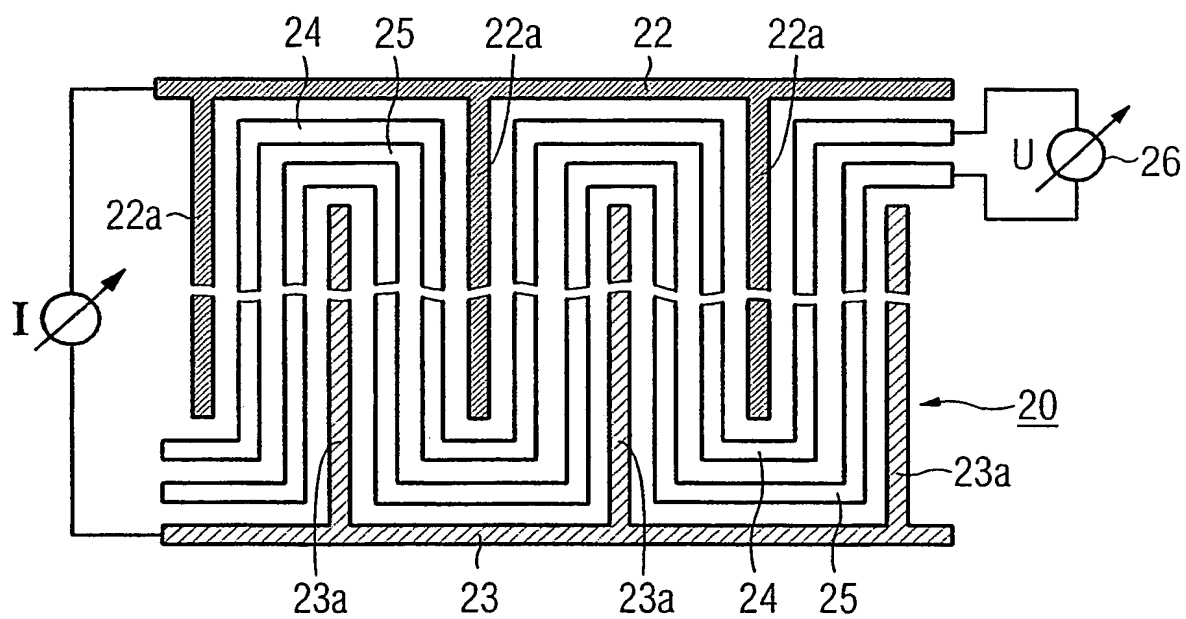


FIG 5





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
DE 03/04137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/62047 A (BREDEHORST REINHARD ; ALBERS JOERG (DE); BERNT HELMUT (DE); HINTSCHE R) 19 October 2000 (2000-10-19) page 28 - page 29 page 38 - page 40; claims 2,3,10,24,25; figures 1,2	1-15
X	WO 02/41992 A (MUND KONRAD ; HINTSCHE RAINER (DE); SIEMENS AG (DE); STANZEL MANFRED () 30 May 2002 (2002-05-30) page 5 - page 9; figures 1,3 page 9, line 25 - line 30; figure 3	1,2,5,9, 14,15
Y		1-15
Y	DE 196 10 115 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG) 18 September 1997 (1997-09-18) column 5, line 54 - column 6, line 38	1-15
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 May 2004

Date of mailing of the international search report

26/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Komenda, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

DE 03/04137

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 534 132 A (VREEKE MARK ET AL) 9 July 1996 (1996-07-09) column 3, line 40 - line 56; figure 1	1
A	PROUDNIKOV D ET AL: "IMMOBILIZATION OF DNA IN POLYACRYLAMIDE GEL FOR THE MANUFACTURE OF DNA AND DNA-OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 259, 1998, pages 34-41, XP002928888 ISSN: 0003-2697 abstract	1
A	MARQUETTE CHRISTOPHE A ET AL: "Regenerable immunobiosensor for the chemiluminescent flow injection analysis of the herbicide 2,4-D" 7 February 2000 (2000-02-07), TALANTA, VOL. 51, NR. 2, PAGE(S) 395-401 , XP002279239 ISSN: 0039-9140 abstract	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

DE 03/04137

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0062047	A	19-10-2000	DE 19916921 A1	19-10-2000
			WO 0062048 A2	19-10-2000
			WO 0062047 A1	19-10-2000
			EP 1200817 A2	02-05-2002
WO 0241992	A	30-05-2002	DE 10058394 C1	11-07-2002
			CA 2430217 A1	30-05-2002
			WO 0241992 A2	30-05-2002
			EP 1339495 A2	03-09-2003
			US 2004029203 A1	12-02-2004
DE 19610115	A	18-09-1997	DE 19610115 A1	18-09-1997
			WO 9734140 A1	18-09-1997
			EP 0886773 A1	30-12-1998
			US 2002028441 A1	07-03-2002
US 5534132	A	09-07-1996	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

DE 03/04137

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/543 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/62047 A (BREDEHORST REINHARD ; ALBERS JOERG (DE); BERNT HELMUT (DE); HINTSCHE R) 19. Oktober 2000 (2000-10-19) Seite 28 - Seite 29 Seite 38 - Seite 40; Ansprüche 2,3,10,24,25; Abbildungen 1,2	1-15
X	WO 02/41992 A (MUND KONRAD ; HINTSCHE RAINER (DE); SIEMENS AG (DE); STANZEL MANFRED () 30. Mai 2002 (2002-05-30) Seite 5 - Seite 9; Abbildungen 1,3	1,2,5,9, 14,15
Y	Seite 9, Zeile 25 - Zeile 30; Abbildung 3	1-15
Y	DE 196 10 115 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG) 18. September 1997 (1997-09-18) Spalte 5, Zeile 54 - Spalte 6, Zeile 38	1-15
	----- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Mai 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Komenda, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 534 132 A (VREEKE MARK ET AL) 9. Juli 1996 (1996-07-09) Spalte 3, Zeile 40 - Zeile 56; Abbildung 1 -----	1
A	PROUDNIKOV D ET AL: "IMMOBILIZATION OF DNA IN POLYACRYLAMIDE GEL FOR THE MANUFACTURE OF DNA AND DNA-OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 259, 1998, Seiten 34-41, XP002928888 ISSN: 0003-2697 Zusammenfassung -----	1
A	MARQUETTE CHRISTOPHE A ET AL: "Regenerable immunobiosensor for the chemiluminescent flow injection analysis of the herbicide 2,4-D" 7. Februar 2000 (2000-02-07), TALANTA, VOL. 51, NR. 2, PAGE(S) 395-401 , XP002279239 ISSN: 0039-9140 Zusammenfassung -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC 03/04137

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0062047 A	19-10-2000	DE 19916921 A1	19-10-2000
		WO 0062048 A2	19-10-2000
		WO 0062047 A1	19-10-2000
		EP 1200817 A2	02-05-2002
WO 0241992 A	30-05-2002	DE 10058394 C1	11-07-2002
		CA 2430217 A1	30-05-2002
		WO 0241992 A2	30-05-2002
		EP 1339495 A2	03-09-2003
		US 2004029203 A1	12-02-2004
DE 19610115 A	18-09-1997	DE 19610115 A1	18-09-1997
		WO 9734140 A1	18-09-1997
		EP 0886773 A1	30-12-1998
		US 2002028441 A1	07-03-2002
US 5534132 A	09-07-1996	KEINE	

